

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

AB JP 11269192 A UPAB: 19991215

IgE-IgE receptor binding inhibitory flavone derivatives of formula (I) are used for antiallergic agents, cosmetics, quasi drugs and foods. One of R1-R4 = 2-methyl-3,4,5-trihydroxytetrahydropyran-6-yl and the others are H.

USE - Treatment of type I allergic diseases including atopic dermatitis and pollinosis.

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 1 1 - 2 6 9 1 9 2

(43) 公開日 平成11年(1999)10月5日

(51) Int. Cl. °	識別記号	F I	
C 0 7 H	17/07	C 0 7 H	17/07
A 2 3 L	1/30	A 2 3 L	1/30 Z
A 6 1 K	7/00	A 6 1 K	7/00 F
	7/48		7/48
	31/70		31/70
	A B F		A B F
審査請求	未請求	請求項の数 6	〇 L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-75654

(22) 出願日 平成10年(1998)3月24日

(71) 出願人 000110918

ニッカウキスキー株式会社
東京都港区南青山5丁目4番31号

(71) 出願人 592172921

羅 智靖
千葉県千葉市花見川区花園2-14-13

(72) 発明者 堀 正義

千葉県柏市増尾字松山967番地 ニッカウ
キスキー株式会社生産技術研究所内

(72) 発明者 渋谷 一郎

千葉県柏市増尾字松山967番地 ニッカウ
キスキー株式会社生産技術研究所内

(74) 代理人 弁理士 渡邊 一平

最終頁に続く

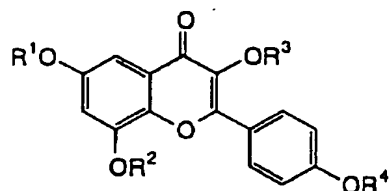
(54) 【発明の名称】 フラボン配糖体

(57) 【要約】

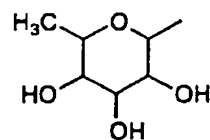
【課題】 I g E の I g E レセプターへの結合を阻害することにより、アレルギー症状を包括的に改善できる医薬、化粧品、食品等を提供する。

【解決手段】 下記一般式 (I) で示されるフラボン配糖体。

【化 1】



(I)



(II)

(但し、R¹、R²、R³、R⁴のうち、いずれか1つは下式 (II) で示される基であり、他は水素原子。

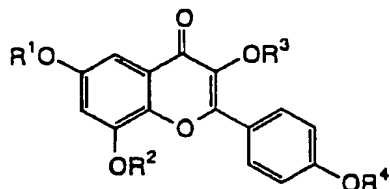
【化 2】

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記一般式 (I) で示されるフラボン配糖体。

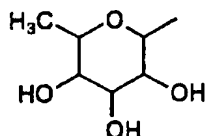
【化 1】



(I)

(但し、R¹、R²、R³、R⁴のうち、いずれか1つは下式 (II) で示される基であり、他は水素原子。

【化 2】



(II)

【請求項 2】 請求項 1 に記載のフラボン配糖体を有効成分とすることを特徴とする I g E-I g E レセプター結合阻害剤。

【請求項 3】 請求項 1 に記載のフラボン配糖体を有効成分とすることを特徴とする抗アレルギー性医薬。

【請求項 4】 請求項 1 に記載のフラボン配糖体を含有することを特徴とする化粧品。

【請求項 5】 請求項 1 に記載のフラボン配糖体を含有することを特徴とする医薬部外品。

【請求項 6】 請求項 1 に記載のフラボン配糖体を含有することを特徴とする食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、I g E-I g E レセプター結合阻害剤として、医薬、化粧品、食品等に好適に用いられるフラボン配糖体に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来より、抗アレルギー活性を有する化合物は種々知られており、代表的なものとしては、クロモグリク酸ナトリウム、イブジラスト等を挙げることができる。

【0003】 一方、アレルギー反応は以下のようにして起きる。花粉、ダニ中のアレルギーゲンが体内に侵入するとヒト I g E 抗体が作られ、血液や粘膜に多く存在する好塩基球、肥満細胞等の表面の高親和性 I g E レセプター

2

(F c ε R I) と結合し感作状態となる。そして再び同じ抗原が侵入し、この感作された細胞上のヒト I g E 抗体と結合すると、これが引き金となって細胞からヒスタミンやロイコトリエンといった化学伝達物質が遊離し、これらの物質が涙や鼻汁を多量に分泌させたり、咳、皮膚の痒み等を引き起こす。従って、ヒト I g E 抗体の I g E レセプターへの結合を阻害することができれば、これらの化学伝達物質の放出を阻止することができ、アレルギー疾患に対する有効な治療となり得る (日医雑誌、第 114 巻、第 9 号 (1995)、日本医師学会; 実験医学増刊号、12 巻、17 号 (1994)、羊土社)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、上記のクロモグリク酸ナトリウムは抗ヒスタミン活性を通じて抗アレルギー作用を発揮するものであり、又、イブジラストはロイコトリエンの遊離抑制を通じて抗アレルギー作用を発揮するものであることから、アレルギー症状の包括的な改善という観点からは不十分なものであった。なお、特開平 2-53717 号公報には、バラ科ノイバラ又はその近縁植物の偽果又は果実 (エイジツ、営実) がヒアルロニダーゼ阻害活性を有することが示唆されているが、I g E の I g E レセプターへの結合阻害による抗アレルギー作用についての言及は無く、又、実際に調べたところにおいても阻害活性はなかった。さらに、特開平 9-124498 号公報には、バラ科のエラジタンニンが抗アレルギー作用を有することが示唆されているが、I g E の I g E レセプターへの結合阻害については言及がない。

【0005】 又、近年におけるアトピー性皮膚炎、花粉症をはじめとする I 型アレルギー反応に関与するアレルギー疾患の増加に伴い、化粧品、食品等に、抗アレルギー作用を付加する試みが行われている。

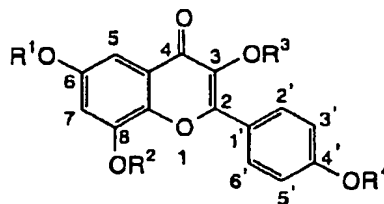
【0006】 従って、I g E の I g E レセプターへの結合を阻害することにより、アレルギー症状を包括的に改善できる医薬、化粧品、食品等が切望されている。

【0007】

【課題を解決するための手段】 即ち、本発明によれば、下記一般式 (I) で示されるフラボン配糖体が提供される。

【0008】

【化 3】



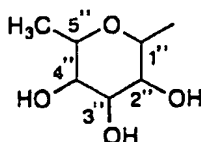
(I)

3

【0009】(但し、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 のうち、いずれか1つは下式(II)で示される基であり、他は水素原子。

【0010】

【化4】



(II)

)

【0011】又、本発明によれば、上記のフラボン配糖体を有効成分とするI g E—I g Eレセプター結合阻害剤及び上記のフラボン配糖体を有効成分とする抗アレルギー性医薬、上記のフラボン配糖体を含有する化粧品、医薬部外品及び食品が提供される。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明化合物(I)には、水和物、各種溶媒和物等が含まれる。さらに、本発明化合物には結晶多形を有する化合物もあり、本発明化合物にはそれらの結晶形がすべて包含される。

【0013】また、本発明化合物は、酸付加塩又は塩基付加塩を形成する場合がある。塩としては、製薬学的に許容される塩であれば特に制限はないが、酸付加塩としては、具体的に塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の有機酸との酸付加塩等が挙げられる。又、塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム等の無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン等の有機塩基、リジン、オルニチン等の塩基性アミノ酸との塩基付加塩等が挙げられる。

【0014】さらに、本発明化合物(I)は、ラムノースとフラボンよりなるフラボン配糖体であるが、本発明化合物(I)には、不斉炭素原子の存在に基づく異性体及びラムノースの1''とフラボン水酸基の3、6、8、4の結合のいずれかによる異性体の混合物や単離されたものを包含する。

【0015】(製造法) 本発明化合物は、本発明化合物を含有する植物、例えばバラ科バラ属に属する植物から抽出・単離して製造される。上記植物の場合、茎、根、葉、花のいずれを用いてもよい。

【0016】抽出に用いる植物は、バラ科バラ属に属する植物としてはバラ(*Rosa spp.*)が好ましく、具体的

4

には、ロサ・ガリカ(*Rosa gallica*)、ロサ・モスカタ(*Rosa moschata*)、ロサ・フォエティダ(*Rosa foetida*)、ロサ・ギガンテア(*Rosa gigantea*)、ノイバラ(*Rosa multiflora*)、テリハノイバラ(*Rosa wichuriana*)等の野生種、又はこれらを交配して得られた園芸種の花、葉又は茎を用いることが好ましい。

【0017】抽出には、水単独で、又は水とメタノール、エタノール若しくはアセトン等の極性溶媒との混合溶媒が用いられ、抽出温度は室温から溶媒の沸点までの温度から適宜選択されるが、50~70℃程度の熱水を用いることが望ましい。又、抽出方法としては、洗浄後、乾燥し、細断した原料を、その5倍から50倍程度、望ましくは20倍程度の熱水と混合し、そのまま30分~1日浸漬後、膜処理等により濾過し、さらに減圧濃縮等により水を留去し、凍結乾燥物を得る。

【0018】精製方法としては、上記乾燥物をオクタデノシル基化学結合型シリカゲル(例えばPreparative C18, 125 Å, 55-105 μm, Waters社製)含有のカラムに、上記凍乾物水溶液を通して、ポリフェノール画分を吸着させる。次いで、蒸留水を通すことにより洗浄した後、10~100%のメタノール、エタノール等の溶液をカラムに通すことにより(好ましくは30~50%メタノール溶液)、粗ポリフェノール画分を得て、さらにHPLC用のカラムにより本発明化合物を得る。

【0019】本発明化合物は、I g Eレセプターへの親和性が大きいと、I g EのI g Eレセプターへの結合を競争的に阻害することにより抗アレルギー作用を示す。従って、好塩基球、肥満細胞からのヒスタミン等の放出を阻止することができ、アレルギー症状を包括的に改善することが可能となる。

【0020】従って、本発明化合物は、医薬の成分として好適に用いることができるとともに、食品、化粧品等に添加することにより、これらに抗アレルギー機能を付与することができる。

【0021】本発明化合物を含有する医薬は、公知の医薬用担体と共に製剤化することにより調製され、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤等の経口剤、坐剤、軟膏、噴霧剤、注射剤等の非経口剤とすることができる。

【0022】又、本発明化合物は、飲料を含む、広く食品一般に添加して用いることができ、具体例としては、酒、炭酸飲料、果実飲料、コーヒー、紅茶、茶、乳酸菌飲料、ヨーグルト、アイスクリーム、飴、ガム、菓子、パン、麺類等に好適に用いられる。

【0023】さらに、本発明化合物が添加される化粧品としては、具体的には、石鹸、洗顔料、クリーム、乳液、化粧水、オーデコロン、ひげそり用クリーム、ひげそり用ローション、化粧油、日焼け・日焼け止めローション、日焼け・日焼け止めオイル、おしろいパウダー、

ファンデーション、香水、パック、爪クリーム、エナメル、エナメル除去液、眉墨、ほお紅、アイクリーム、アイシャドー、マスカラ、アイライナー、口紅、リップクリーム及び浴用化粧品等の皮膚化粧品、シャンプー、リンス、染毛料及び頭髪用化粧品等の毛髪化粧品、並びに歯みがき等が挙げられる。又、薬用化粧品、薬用歯みがき類、浴用剤等の医薬部外品にも好適に用いることができる。

【0024】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づいてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に制限されるものではない。

【0025】（実施例1）本発明化合物を以下のように製造した。バラ科バラ属に属する植物であるローズミニパツピンクの乾燥物、100gを破碎して50～70℃の熱水、2lにて30分間抽出した。次に、濾過により抽出液を分離し、50℃にて5～10時間、加熱濃縮後、凍結乾燥を行い熱水抽出物を約30g得た。

【0026】上記抽出物の5%水溶液を用いてカラムクロマトグラフィーにて分画を繰り返した。内径2.5cm、長さ16cmのカラムに、ゲルとしてFS-1801（シリカC18：75～150 μ m、オルガノ社製）80mlを充填したものをを用い、10%から100%まで、メタノールの濃度を10%ずつ濃くしつつ、流速5ml/分で段階的に溶出させた後、凍結乾燥を行い、抽出物を得た。

【0027】各画分について、IgEレセプター阻害活性をELISA法にて調べた。結果を表1に示す。尚、対照として、ヒスタミン遊離抑制剤であるフマル酸ケチフェン及び各種植物抽出物の阻害活性も示す。

【0028】尚、ELISA法によるIgEレセプター阻害活性の測定は、以下の方法にて行った。IgEレセプターを固着させたウェルに、最終濃度が0.1、0.01%（w/v）となるように調製した試料及び最終濃度が0.4 μ g/mlとなるようにヒトIgEを加えてインキュベーションを行った後、洗浄を行い、遊離の試料及びヒトIgEを除去した。次に、西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRP）を結合した抗ヒトIgE抗体を濃度が0.4 μ g/mlとなるように加えてインキュベーションを行った後、洗浄を行い、遊離の抗ヒトIgE抗体を除去した。次に、HRPの基質としてo-フェニレンジアミン二塩酸塩（OPD）を各ウェルに注いでHRPと反応させ、発色させた後、各ウェルの吸光度をプレートリーダーにて測定した。得られた吸光度の値に基づいてIgEレセプター阻害活性を算出した。ヒトIgEを添加しなかった場合の吸光度を発色率0%、ヒトIgEのみを添加して試料を加えなかった場合の吸光度を発色率100%として各試料の発色率を算出し、各試料の発色率を100から差し引いた値をIgEレセプター阻害活性（%）とした。

【0029】

【表1】

10

20

種類	試料	阻害活性 (%)	
		濃度 0.1 %	0.01 %
バラの分画物	バラ熱水抽出物	98	38
	試料通過	0	0
	洗浄	68	18
	10%メタノール	100	54
	20%メタノール	98	63
	30%メタノール	98	74
	40%メタノール	99	80
	50%メタノール	100	36
	60%メタノール	99	50
	80%メタノール	91	45
	100%メタノール	20	9
ハーブ	レモンミント	92	0
	キャットニップ	65	0
	セージ	37	0
	フェンネル	8	0
	レモングラス	0	0
花	スターチス	67	11
	ダリア	20	0
野菜	モロヘイヤ	35	0
	ブロッコリー	10	0
	レタス	9	0
	ニンジン	0	0
果物	スイカ	0	0
	バナナ	0	0
	オレンジ	0	0
	モモ	0	0
市販エキス	シソエキス	0	0
	エゾウコギエキス	0	0
抗アレルギー剤	フマル酸ケトチフェン	0	0

【0030】IgEレセプター阻害活性は、10～80%メタノール画分に渡って広く分布していた。次に、IgEレセプター阻害活性の強かった30～50%メタノール画分、約4.6gについて、HPLCにより、さらに、分画、精製を行った。

【0031】試料は、分取した30～50%メタノール画分を凍結乾燥し、40%メタノールで2% (W/V) 試料濃度に再度溶解したものを用いた。カラムは内径6mm、長さ250mmのInertsil PREP-ODS (ジーエルサイエンス社製) を用い、移動相には40%メタノールと60%メタノールを用いた。注入量は100μlとし、流量は1ml/分とした。又、検出は250nmにおける紫外線吸収を測定することにより行った。尚、溶出は40%メタノールにて開始し、溶出

開始後20分までの間に、徐々に60%メタノールに変換し、60%メタノールで5分間溶出した後、2.5分間で連続的に40%メタノールに変換し、さらに2.5分間40%メタノールで溶出を行った。図1に結果を示す。

【0032】溶出開始後約20分で溶出したピーク1について20回分取を行った後、凍結乾燥し、1.8mgのフラボン配糖体を得た。この精製品のIgEレセプター阻害活性をELISA法にて調べたところ、表2に示すように、0.01% (W/V) の濃度にて86%の高い阻害活性を示した。

【0033】

【表2】

試料	阻害活性 (%)	
	濃度 0.1%	0.01%
バラ熱水抽出物	98	38
フラボン配糖体	100	86
ニンジン熱水抽出物	0	0
フマル酸ケトチフェン	0	0

【0034】以下に、フラボン配糖体の各種物性値を示す。

質量分析値 (m/z): 433 [FAB, (M+1)]

¹H核磁気共鳴スペクトル (CDC1₃+CD₃OD)

δ: 0.92 (3H, d, J_{5',6'}=6.3 Hz, H-6"), 3.20 (1H, dd, J_{4',5'}=9.6 Hz, J_{5',6'}=6.3 Hz, H-5"), 3.33 (1H, t, J_{3',4'}=J_{4',5'}=9.6 Hz, H-4"), 3.71 (1H, dd, J_{2',3'}=3.3 Hz, J_{3',4'}=9.2 Hz, H-3"), 4.26 (1H, dd, J_{1',2'}=1.7 Hz, J_{2',3'}=3.3 Hz, H-2"), 5.42 (1H, d, J_{1',2'}=1.7 Hz, H-1"), 6.27及び6.92 (2H, d, J_{5,7}=2.0 Hz, H-5及びH-7), 6.94及び7.74 (4H, d, J_{2',3'}=J_{5',6'}=8.9 Hz, H-2', H-3', H-5'及びH-6')。

【0035】又、図2及び図3に、実施例1で得たフラボン配糖体について、FAB-MS及び¹H-NMRによるスペクトル図を示す。

【0036】(実施例2) 実施例1で得たフラボン配糖体について、ヒスタミン遊離抑制作用を調べた。常法*

*により、ヒト抹消血より分離した好塩基球に、乳酸処理と洗浄を行い、IgEレセプターに結合したヒトIgE抗体を除いた。次に、TBS-HSAに溶解した試料を0.1、0.01% (W/V) の濃度となるように加えた後、濃度が1μg/mlとなるように新たにヒトIgE抗体を加えて、室温、1時間で好塩基球を感作した。TBS-HSAにて洗浄し、遊離のヒトIgE抗体を除去した後、濃度が3μg/mlになるように抗ヒトIgE抗体を加えて、37℃で40分間インキュベーションを行った。上清を回収して過塩素酸で処理した後、HPLCにて上清中のヒスタミン量を測定した。ヒスタミン遊離抑制率 (%) は、次の式により算出した。

$$\{1 - (SR - C) / (R - C)\} \times 100$$

【0037】尚、式中、Cは未処理の細胞より遊離されるヒスタミンの量を、Rは試料を加えずにヒトIgE抗体及びヒトIgE抗体により刺激した場合に遊離したヒスタミンの量を、SRは試料の存在下でヒトIgE抗体と抗ヒトIgE抗体により刺激した場合に遊離したヒスタミンの量を表す。結果を表3に示す。

【0038】

【表3】

試料	試料濃度 (%)	ヒスタミン遊離抑制率 (%)
フラボン配糖体	0.1	227
フラボン配糖体	0.01	71

【0039】表3より、フラボン配糖体は、好塩基球からのヒスタミンの遊離を顕著に抑制することがわかる。

【0040】(実施例3) 下記の成分を常法により混和して得た混合物を打錠機にて打錠し、実施例1で得たフラボン配糖体を含有する錠剤1個を製造した。

フラボン配糖体 150mg
D-マンニトール 145mg
ステアリン酸マグネシウム 5mg

【0041】(実施例4) 下記の成分を常法により混和し、実施例1で得たフラボン配糖体を含有する浴用剤を製造した。

フラボン配糖体 3.0重量%
炭酸水素ナトリウム 55.0重量%
硫酸ナトリウム 40.0重量%
色素 1.0重量%
香料 1.0重量%

【0042】(実施例5) 下記の成分を常法により混和し、実施例1で得たフラボン配糖体を含有するクリームを製造した。

フラボン配糖体 0.2重量%
ワセリン 30.0重量%
流動パラフィン 20.0重量%
パラフィン 7.0重量%
ラノリン 4.0重量%
セスキオレイン酸ソルビタン 4.0重量%
プロピレングリコール 2.5重量%
硫酸マグネシウム 0.2重量%
バラオキシ安息香酸メチル 0.2重量%
水 31.7重量%
香料 0.2重量%

【0043】(実施例6) 下記の成分を常法により混和し、実施例1で得たフラボン配糖体を含有する化粧水

を製造した。

フラボン配糖体	0.20重量%
エチルアルコール	10.00重量%
1,3-ブチレングリコール	6.00重量%
グリセリン	5.00重量%
モノラウリン酸ポリオキシエチレン	
ソルビタン(20E.O.)	1.00重量%
パラオキシ安息香酸メチル	0.20重量%
クエン酸	0.01重量%
香料	0.20重量%
水	77.39重量%

【0044】(実施例7) 下記の成分を常法により混和し、実施例1で得たフラボン配糖体を含有する飲料を製造した。

フラボン配糖体	0.2重量%
果汁	20.0重量%
ショ糖	6.0重量%
蜂蜜	5.0重量%
L-アスコルビン酸	0.1重量%
香料	0.1重量%
色素	0.1重量%
水	68.5重量%

【0045】(実施例8) 下記の成分を常法により混和し、実施例1で得たフラボン配糖体を含有する飴を製造した。

フラボン配糖体	0.2重量%
ショ糖	52.0重量%
水飴	46.4重量%
クエン酸	1.0重量%
香料	0.2重量%

色素 0.2重量%

【0046】

【発明の効果】本発明のフラボン配糖体は、抗アレルギー作用を有し、医薬の成分としてのみならず、化粧品、食品、浴用剤等にも好適に用いることができ、これらに抗アレルギー作用を付与することができる。又、IgEのIgEレセプターへの結合を阻害することにより抗アレルギー作用を発揮するため、アトピー性皮膚炎、花粉症等のI型アレルギー反応に関与するアレルギー症状の包括的な改善が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明化合物のHPLCによるピークを示すグラフである。

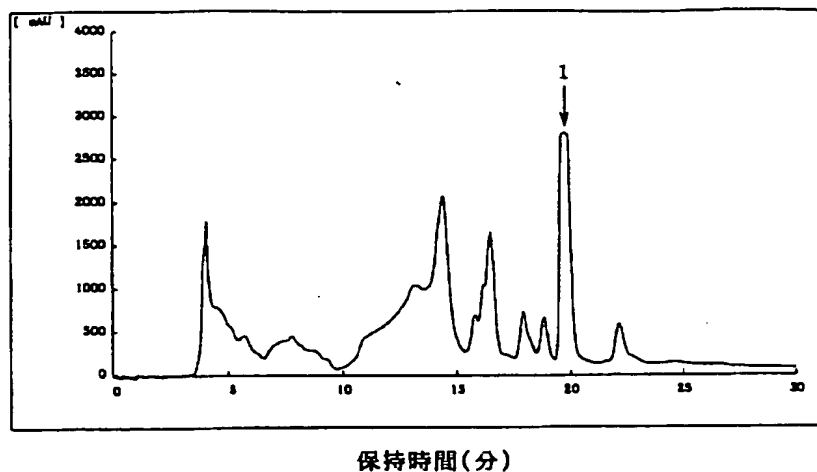
【図2】 本発明化合物のFAB-MSによるスペクトル図である。

【図3】 本発明化合物の¹H-NMRによるスペクトル図である。

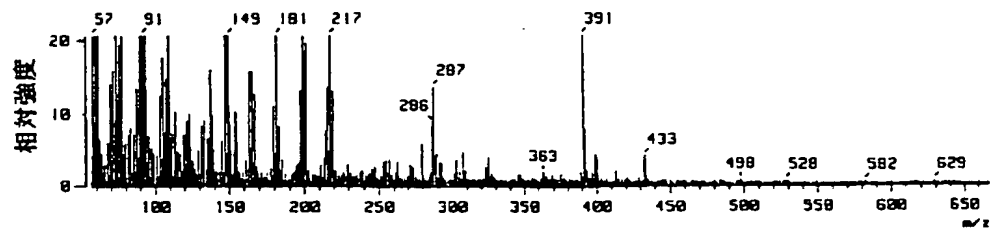
【符号の説明】

1…フラボン配糖体のピーク。

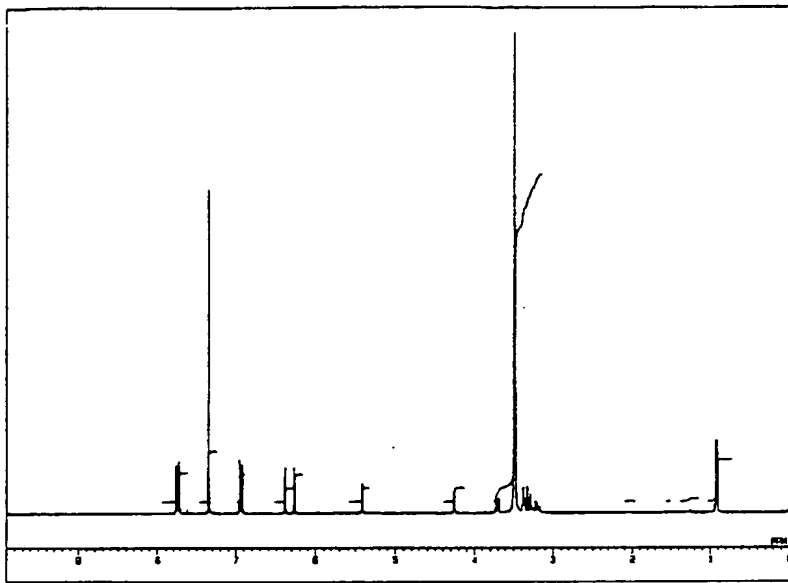
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 31/70	ADA	A 6 1 K 31/70	ADA
	AED		AED
C 0 7 H 15/26		C 0 7 H 15/26	
// A 2 3 G 3/00	1 0 1	A 2 3 G 3/00	1 0 1
A 6 1 K 7/50		A 6 1 K 7/50	

(72) 発明者 平井 光雄
千葉県柏市増尾字松山967番地 ニッカウ
キスキー株式会社生産技術研究所内

(72) 発明者 羅 智靖
千葉県千葉市花見川区花園2-14-13